

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-112715

(P 2 0 0 2 - 1 1 2 7 1 5 A)

(43) 公開日 平成14年4月16日 (2002. 4. 16)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
A23L 1/076		A23L 1/076	4B018
1/30		1/30	A 4B041

審査請求 有 請求項の数 5 O L (全11頁)

(21) 出願番号 特願2000-303562 (P 2000-303562)

(22) 出願日 平成12年10月3日 (2000. 10. 3)

(71) 出願人 591045471

アピ株式会社

岐阜県岐阜市加納桜田町1丁目1番地

(72) 発明者 富田 和久

岐阜市加納桜田町1丁目1番地 アピ 株式会社内

(72) 発明者 鈴木 和道

岐阜市加納桜田町1丁目1番地 アピ 株式会社内

(74) 代理人 100068755

弁理士 恩田 博宣 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低アレルギー化ローヤルゼリー及びその製造方法

## (57) 【要約】

【課題】 実質的に発現されない程度にアレルギー性を低減させることができるように構成された低アレルギー化ローヤルゼリー及びその製造方法を提供する。

【解決手段】 低アレルギー化ローヤルゼリーは、ローヤルゼリーに糖分解酵素処理及び蛋白質分解酵素処理を施したものである。糖分解酵素はβ-マンノシダーゼであるのが好ましく、蛋白質分解酵素はマイクロバイアル・アスパルティック・プロテアーゼであるのが好ましい。この低アレルギー化ローヤルゼリーは、ローヤルゼリーを所定量の水又は緩衝液に溶解した後、溶液のpHを6.3～7.3に調整して等電点沈澱法により沈澱画分を分画し、その沈澱画分に糖分解酵素処理及び蛋白質分解酵素処理を施し、さらに前記等電点沈澱法における可溶性画分と混合することによって製造するのが好ましい。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ローヤルゼリーに、糖分解酵素処理及び蛋白質分解酵素処理を施すことにより、実質的に発現されない程度にアレルギー性を低減させたことを特徴とする低アレルギー化ローヤルゼリー。

【請求項 2】 前記糖分解酵素は  $\beta$ -マンノシダーゼであることを特徴とする請求項 1 に記載の低アレルギー化ローヤルゼリー。

【請求項 3】 前記蛋白質分解酵素はマイクロバイアル・アスパルティック・プロテアーゼであることを特徴とする請求項 1 又は請求項 2 に記載の低アレルギー化ローヤルゼリー。

【請求項 4】 ローヤルゼリーを所定量の水又は緩衝液に溶解し、糖分解酵素処理及び蛋白質分解酵素処理を施したことを特徴とする低アレルギー化ローヤルゼリーの製造方法。

【請求項 5】 ローヤルゼリーを所定量の水又は緩衝液に溶解した後、溶液の pH を 6. 3 ~ 7. 3 に調整して等電点沈澱法により沈澱画分を分画し、その沈澱画分に糖分解酵素処理及び蛋白質分解酵素処理を施し、さらに前記等電点沈澱法における可溶性画分と混合したことを特徴とする低アレルギー化ローヤルゼリーの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、実質的に発現されない程度にアレルギー性を低減させることができるように構成された低アレルギー化ローヤルゼリー及びその製造方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】従来より、ローヤルゼリーを摂取したときにアレルギー症状が引き起こされる場合があり、時にアナフィラキシーショック等の非常に重篤な症状を引き起こすことが報告され、深刻な問題となっている。このローヤルゼリーに関して、基質に対する作用部位の異なる 2 種類以上の蛋白質分解酵素を同時又は逐次添加して処理した報告は、例えば、特開平 5 - 1 2 3 1 1 9 号公報、特開平 8 - 5 9 4 9 9 号公報、特開平 8 - 1 0 4 6 4 5 号公報及び特開平 1 1 - 2 6 9 0 7 8 号公報に開示されている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】ところが、前記従来の蛋白質分解酵素を作用させたローヤルゼリーでは、ローヤルゼリーを飲料に適用したり、細菌やウイルスに対する感染防御機能の増強効果、経口摂取用の育毛剤、カルシウムの吸収促進効果等の生理機能に着目したものであり、アレルギー性を低減させることができるようには構成されていなかった。

【0004】この発明は、上記のような従来技術に存在する問題点に着目してなされたものである。その目的とするところは、実質的に発現されない程度にアレルギー

性を低減させることができるように構成された低アレルギー化ローヤルゼリー及びその製造方法を提供することにある。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成するために、請求項 1 に記載の発明の低アレルギー化ローヤルゼリーは、ローヤルゼリーに、糖分解酵素処理及び蛋白質分解酵素処理を施すことにより、実質的に発現されない程度にアレルギー性を低減させたことを特徴とするものである。

【0006】請求項 2 に記載の発明の低アレルギー化ローヤルゼリーは、請求項 1 に記載の発明において、前記糖分解酵素は  $\beta$ -マンノシダーゼであることを特徴とするものである。

【0007】請求項 3 に記載の発明の低アレルギー化ローヤルゼリーは、請求項 1 又は請求項 2 に記載の発明において、前記蛋白質分解酵素はマイクロバイアル・アスパルティック・プロテアーゼであることを特徴とするものである。

【0008】請求項 4 に記載の発明の低アレルギー化ローヤルゼリーの製造方法は、ローヤルゼリーを所定量の水又は緩衝液に溶解し、糖分解酵素処理及び蛋白質分解酵素処理を施したことを特徴とするものである。

【0009】請求項 5 に記載の発明の低アレルギー化ローヤルゼリーの製造方法は、ローヤルゼリーを所定量の水又は緩衝液に溶解した後、溶液の pH を 6. 3 ~ 7. 3 に調整して等電点沈澱法により沈澱画分を分画し、その沈澱画分に糖分解酵素処理及び蛋白質分解酵素処理を施し、さらに前記等電点沈澱法における可溶性画分と混合したことを特徴とするものである。

## 【0010】

【発明の実施の形態】以下、この発明を具体化した実施形態を詳細に説明する。本実施形態の低アレルギー化ローヤルゼリーは、ローヤルゼリーに、糖分解酵素処理及び蛋白質分解酵素処理を施すことにより、実質的に発現されない程度にアレルギー性を低減させるように構成したものである。

【0011】ローヤルゼリーは、蜜蜂のうち日齢 3 ~ 1 2 日の働き蜂が下咽頭腺及び大腮腺から分泌する分泌物を混合してつくる乳白色のゼリー状物質である。このローヤルゼリーは、人体に対し好ましい生理活性を持つことが知られている。このローヤルゼリー中の主な生理活性成分としては、例えば、ローヤルゼリーに特有な 10 - ハイドロキシデセン酸等の有機酸類をはじめ、蛋白質、脂質、糖類、ビタミン B 類や葉酸、ニコチン酸、パントテン酸等のビタミン類、各種ミネラル類、ホルモン様物質等が挙げられる。このローヤルゼリーの生理活性や薬理作用としては、抗菌作用、免疫増強作用、抗腫瘍作用、抗炎症作用、血流増加作用等が知られている。また、制癌剤の副作用低減や放射線傷害時の延命効果も報

告されている。

【0012】さらに、このローヤルゼリー中には、生体にアレルギー反応を引き起こす種々のアレルゲンが含有されている。前記ローヤルゼリー中に含まれるアレルゲンとしては、例えば、SDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）にて分子量47～55kDa付近に見られる複数種の蛋白質バンドが挙げられる。このうち、分子量55kDaの蛋白質は、主要なアレルゲンである。

【0013】本実施形態の低アレルゲン化ローヤルゼリーの製造に用いられる原料としては、生ローヤルゼリー又はローヤルゼリー粉末（生ローヤルゼリーを乾燥させて粉末化したもの）が好適に使用される。また、前記ローヤルゼリーの産地は、中国、ブラジル、ヨーロッパ諸国、オセアニア諸国、アメリカ等いずれであってもよい。

【0014】糖分解酵素は糖鎖に作用し、その結合を切断する酵素である。この糖分解酵素としては、例えば、セルラーゼ、アビセルラーゼ、ヘミセルラーゼ、グルコシダーゼ、マンナナーゼ、ガラクトシダーゼ、キシラナーゼ等が挙げられる。これら糖分解酵素のうち、ローヤルゼリーのアレルギー性を低減させる効果が高いことから、β-マンノシダーゼを使用するのがより好ましい。一方、この糖分解酵素としては、2種以上を適宜組み合わせ使用してもよい。また、使用される酵素の純度は特に規定されず、例えば、酵素を産出する微生物生産物、植物又は動物からのホモジネートを用いても構わない。

【0015】蛋白質分解酵素は蛋白質のペプチド結合を加水分解する酵素である。この蛋白質分解酵素としては、例えば、微生物由来又は植物由来のパパイン、フィチン、プロメライン、マイクロバイアル・アスパルティック・プロテアーゼの一種アスペルギロペプチダーゼAや、動物由来の消化酵素であるペプシン、パンクレアチン等が挙げられる。これら蛋白質分解酵素のうち、至適pHがローヤルゼリーのpHとほぼ同じ3～4であることと加水分解能力が高いことから、アスペルギロペプチダーゼAを使用するのが最も好ましい。一方、この蛋白質分解酵素としては、2種以上を適宜組み合わせ使用してもよい。また、使用される酵素の純度は特に規定されず、例えば、酵素を産出する微生物生産物、植物又は動物からのホモジネートを用いても構わない。

【0016】この低アレルゲン化ローヤルゼリーの利用形態としては、例えば、液状（ドリンク剤）、凍結乾燥、減圧乾燥又はその他の粉末化手段による粉末状、これに賦形剤を添加した錠剤、カプセル剤、さらに化粧品剤の基剤を混合したクリームやローション等が挙げられる。

【0017】上記低アレルゲン化ローヤルゼリーの製造方法について以下に記載する。上記低アレルゲン化ロー

ヤルゼリーを製造する際には、まず、溶液の粘度を低下させて各種酵素反応を円滑に進行させるために、上記原料としてのローヤルゼリーを所定量の水又は緩衝液で希釈して十分に混合攪拌するのが好ましい。このとき、原料として生ローヤルゼリーを使用する場合には、好ましくは0.5～2倍量、さらに好ましくは等量の水又は緩衝液で希釈するのが好ましい。この希釈するために加えられる水又は緩衝液の量が0.5倍量未満の場合には、ローヤルゼリー溶液の粘度が比較的高いことから各種酵素反応が円滑に進行しない。逆に2倍量を超える場合には、製造のための設備を巨大化する必要があることから好ましくない。一方、原料としてローヤルゼリー粉末を使用する場合には、前記生ローヤルゼリーの場合と同様の理由で、5～10倍量の水又は緩衝液で希釈するのが好ましい。

【0018】さらに、前記ローヤルゼリー溶液について、溶液のpHを好ましくは6.3～7.3、より好ましくは6.5に調整し、等電点沈澱法を用いて、ローヤルゼリー中の主要なアレルゲンである55kDa蛋白質を含む画分を沈澱させて分画し、その画分に対して後述する各種酵素処理を行うのが好ましい。このとき、ローヤルゼリー中の主要なアレルゲンを集中的に分解してアレルギー性を低減させることができるうえ、ローヤルゼリー中に含まれる有用な生理活性成分の分解を極力抑えることが可能である。

【0019】次に、前記ローヤルゼリー溶液に、糖分解酵素を添加してインキュベートした後、蛋白質分解酵素を添加してインキュベートする。或いは、蛋白質分解酵素を添加してインキュベートした後、糖分解酵素を添加してインキュベートしてもよい。また、糖分解酵素及び蛋白質分解酵素を同時に添加してインキュベートしてもよい。前記酵素をインキュベートする際には、各酵素の至適反応条件に近い条件で行うのが好ましい。

【0020】一方、前記等電点沈澱法によってローヤルゼリーを分画した場合には、前記生成された沈澱を分離した後、その沈澱を水又は緩衝液に再溶解して同様に酵素処理する。さらに、前記酵素処理の終了後、前記等電点沈澱法における上清画分を加えて製品化するのが好ましい。このとき、製品化された低アレルゲン化ローヤルゼリー中に、有用な生理活性成分をより多く含有させることができる。

【0021】また、前記各種酵素処理において、添加される酵素量は任意に選ぶことができる。例えば反応を数時間以内の短時間で終了させたい場合には、ローヤルゼリー固形分1gに対して1～10mgの酵素を用いればよいが、使用される酵素の純度により異なる。一方、例えば1日間かけて反応させる場合には、酵素の使用量は0.1～1mg程度で良いが、有用な成分までもが同時に分解されないように十分に留意する必要がある。

【0022】ローヤルゼリー中には数多くの成分が含有

されており、酵素に対し阻害的に働くものもあることから、通常の基質に対して酵素処理を行う場合の10倍以上使用することが好ましい。ただし、これも反応時間との兼ね合いにより任意に選択することができる。酵素反応は酵素の至適温度（例えば40～60℃）で行われる。ローヤルゼリーと酵素との反応は攪拌して行うことがよく、これはアレルギー性物質が水に分散している場合、酵素と十分に接触させるのを促進させることができるためである。

【0023】なお、上記各工程において、溶液中に不溶解物が生成された場合には、適宜遠心分離機又は濾過によりその不溶解物を除去するのが好ましく、前記不溶解物中に有用な生理活性成分が含まれている場合には、製品化前に再添加するのが好ましい。また、必要に応じて溶液のpHを調整してもよく、アルカリ性側であれば炭酸カルシウム又は炭酸水素ナトリウムを添加し、酸性側であればクエン酸又はリンゴ酸を添加することによって、所望とするpHに調整するのが好ましい。さらに、製品化したときの不具合を低減させるために、前記酵素反応の終了後、酵素活性の失活又は除去処理を行うのが好ましい。

【0024】上記実施形態によって発揮される効果について、以下に記載する。

・ 実施形態の低アレルギー化ローヤルゼリーは、ローヤルゼリーに、糖分解酵素処理及び蛋白質分解酵素処理を施すことにより、実質的に発現されない程度にアレルギー性を低減させたものである。このため、例えば、アピシン、ロイヤリシン、10-ハイドロキシデセン酸類等のローヤルゼリー中の有用な活性成分の消失を抑えつつ、実質的に発現されない程度にアレルギー性を低減させることができる。従って、アレルギー症状の発症を心配することなく、ローヤルゼリー本来の薬理作用を充分に発揮させることができるうえ、その摂取量を容易に増やすことができる。

【0025】また、本発明者らが鋭意研究した結果、前記従来のローヤルゼリーに施された処理と同様に、ローヤルゼリーに基質に対する作用部位の異なる2種類以上の蛋白質分解酵素を作用させた場合でも、アレルギー性を確実に低減させることはできなかったことが確認されている。従って、本実施形態の低アレルギー化ローヤルゼリーは、蛋白質分解酵素と糖分解酵素とを作用させることによって、前記従来のローヤルゼリーと比べて、より一層摂取しやすいものであるといえる。

【0026】一方、例えば、特開平7-8185号公報では、アレルギー性を低減させることができるように構成されたプロポリス製品が開示されている。このプロポリス製品は、プロポリスを含有し、加水分解酵素又は酸化還元酵素的作用により、アレルギー物質（アレルギー）をアレルギー性が実質的に発現されない程度に消失させたものである。これに対し、ローヤルゼリーに含

れる主要なアレルギーは、前記従来のプロポリス製品におけるアレルギーとは異なり、前記加水分解酵素処理及び酸化還元酵素処理から選ばれる少なくとも1種の酵素処理によっては十分に分解され得ないことが本発明者らの鋭意研究の結果によって確認されている。

【0027】さらに、使用される加水分解酵素の種類によっては、アレルギーの分解が可能となる一方で、ローヤルゼリー中の有用な生理活性成分の分解をも引き起こしてしまうおそれもあり、特に非特異的に蛋白質を分解するような強力な加水分解酵素を作用させた場合には、ローヤルゼリーを摂取したときの健康増進効果が消失してしまうおそれがあった。これに対し、本実施形態の低アレルギー化ローヤルゼリーでは、蛋白質分解酵素及び糖分解酵素が部位特異的に基質を分解するものであることから、ローヤルゼリー中の有用な生理活性成分の分解を効果的に抑制することができる。

【0028】・ 糖分解酵素としてβ-マンノシダーゼを使用することによって、ローヤルゼリーのアレルギー性を容易かつ確実に低減させることができる。特に、ローヤルゼリー中の主要なアレルギーである分子量55kDaの蛋白質は高マンノース型糖鎖を持つことが知られており、それが抗原決定基を構成している可能性が非常に高い。従って、55kDa蛋白質のペプチド結合を加水分解するとともに、前記高マンノース型糖鎖を分解することによって、より一層効果的に抗原決定基を消失させることができる可能性が高い。

【0029】・ 蛋白質分解酵素としてマイクロバイアル・アスパルティック・プロテアーゼを使用することによって、ローヤルゼリー中のアレルギーに対し効果的に加水分解することができることから、アレルギー性を容易かつ確実に低減させることができる。さらに、このマイクロバイアル・アスパルティック・プロテアーゼの一種であるアスペルギロペプチダーゼAを使用することによって、ローヤルゼリーをそのまま水に溶解したときのpH（3～4）がそのまま至適pHであることから、酵素処理のためにpH調整をする必要がなく、製造時の作業性を容易に高めることができる。

【0030】・ ローヤルゼリーを所定量の水又は緩衝液に溶解した後、溶液のpHを6.3～7.3に調整して等電点沈澱法により沈澱画分を分画し、その沈澱画分に糖分解酵素処理及び蛋白質分解酵素処理を施し、さらに前記等電点沈澱法における可溶性画分と混合することによって低アレルギー化ローヤルゼリーを製造することによって、以下に記載するような利点が挙げられる。すなわち、等電点（pI）が6.3～7.3の範囲内にならぬローヤルゼリー中の有用な生理活性成分（ロイヤリシンやアピシン等）の分解を確実に防止することができる。さらに、等電点沈澱法における沈澱画分にも、細胞の生存を維持したり増殖を促進したりする活性成分が含まれる可能性が高いことから、この画分を捨てないよう

にしつつ、ローヤルゼリー中に含まれる主要なアレルゲンを集中的に分解することができることから、アレルギー性を非常に効率よく低減させることができる。従って、ローヤルゼリー中の有用な活性成分の消失を極力抑えつつ、実質的に発現されない程度にアレルギー性を低減させることができるように構成された低アレルゲン化ローヤルゼリーを容易かつ確実に製造することができる。

#### 【0031】

【実施例】以下、前記実施形態を具体化した実施例及び比較例について説明する。

(比較例1) 中国産生ローヤルゼリー1kgに純水1L(リットル)を加えて均一になるまで攪拌した。このローヤルゼリー懸濁液を100mlずつ7個のビーカーに分取し、各ビーカー内に蛋白質分解酵素0.12mgを添加して50℃で1時間反応させた。なお、前記ビーカー内には以下に記載するいずれか1種類の蛋白質分解酵素が添加されている。前記酵素としては、マイクロバイアル・アスパルティック・プロテアーゼの一種であるアスペルギロペプチダーゼA(盛進(株)製モルシンF)、ペプシン(和光純薬工業(株)製)、パンクレアチン(天野製薬(株)製パンクレアチンF)、パパイン(同左パパインW-40)、プロメライン(同左プロメラインF)、アクチナーゼ(科研製薬(株)製アクチナーゼE)又はアルカロフィリックプロテアーゼ(東洋紡(株)製)である。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理した。

【0032】(比較例2) 中国産生ローヤルゼリー50gに純水50mlを加えて均一になるまで攪拌した。これに蛋白質分解酵素のペプシン0.12mgを添加して50℃で1時間反応させた。その後、蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA0.12mgを添加して60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理した。

【0033】(比較例3) 中国産生ローヤルゼリー1kgに純水1Lを加えて均一になるまで攪拌した。このローヤルゼリー懸濁液を100mlずつ5個のビーカーに分取し、各ビーカー内に糖分解酵素0.12mgを添加して50℃で1時間反応させた。なお、前記ビーカー内には以下に記載するいずれか1種類の糖分解酵素が添加されている。前記酵素としては、 $\alpha$ -マンノシダーゼ(和光純薬工業(株)製)、セルラーゼ(新日本化学工業(株)製スミチームAC)、アピセラゼ(同左スミチームC)、 $\beta$ -マンノシダーゼ(同左スミチームAC H)又は $\alpha$ -アミラーゼ(タイショーテクノス(株)製ソフトアゲン・30)である。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理した。

【0034】(比較例4) 中国産生ローヤルゼリー50

gに純水50mlを加えて均一になるまで攪拌した。これに糖分解酵素のセルラーゼ0.12mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、糖分解酵素の $\beta$ -マンノシダーゼ0.12mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理した。

【0035】(実施例1) 中国産生ローヤルゼリー50gに純水50mlを加えて均一になるまで攪拌した。これに蛋白質分解酵素のペプシン0.12mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、糖分解酵素のセルラーゼ0.12mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理した。

【0036】(実施例2) 中国産生ローヤルゼリー50gに純水50mlを加えて均一になるまで攪拌した。これに蛋白質分解酵素のペプシン0.12mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、糖分解酵素の $\beta$ -マンノシダーゼ0.12mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理した。

【0037】(実施例3) 中国産生ローヤルゼリー50gに純水50mlを加えて均一になるまで攪拌した。これに蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA0.12mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、糖分解酵素のセルラーゼ0.12mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理した。

【0038】(実施例4) 中国産生ローヤルゼリー50gに純水50mlを加えて均一になるまで攪拌した。これに蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA0.12mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、糖分解酵素の $\beta$ -マンノシダーゼ0.12mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理した。

【0039】(実施例5) 中国産生ローヤルゼリー50gに純水50mlを加えて均一になるまで攪拌し、98℃で2分間加熱処理した。これに蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA0.06mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、糖分解酵素の $\beta$ -マンノシダーゼ0.06mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理した。

【0040】(実施例6) 中国産生ローヤルゼリー50gに純水50mlを加えて均一になるまで攪拌した。これに蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA0.12mgと、糖分解酵素の $\beta$ -マンノシダーゼ0.12mgとを同時に添加し、50℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活

せるとともに殺菌処理した。

【0041】（実施例7）中国産生ローヤルゼリー50gに純水50mlを加えて均一になるまで攪拌した。これに蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA0.06mgと、糖分解酵素のβ-マンノシダーゼ0.06mgとを同時に添加し、50℃で16時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理した。

【0042】（実施例8）中国産ローヤルゼリー凍結乾燥粉末10gに純水90mlを加えて均一になるまで攪拌した。これに蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA0.12mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、糖分解酵素のβ-マンノシダーゼ0.12mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理した。

【0043】＜等電点沈澱法によるローヤルゼリーの分画＞中国産生ローヤルゼリー1kgに純水1Lを加えて均一になるまで攪拌した。このローヤルゼリー懸濁液を3000rpmで20分間遠心分離した（1度目の遠心分離）。この1度目の遠心分離によって得られた沈澱画分を保存した。以下、この沈澱画分をローヤルゼリーの水不溶性画分と記載する。

【0044】次に、前記1度目の遠心分離における上清画分に、1N NaOHを加えてpH6.5に調整した。これをさらに3000rpmで20分間遠心分離し（2度目の遠心分離）、沈澱に100mlの水を加えた後、0.1N HClを用いてpH3.5に調整した。このpH6.5で等電点沈澱された沈澱画分には、主要なアレルギー物質である55kDa蛋白質が含まれており、以下、アレルギー物質画分と記載する。

【0045】さらに、前記2度目の遠心分離によって得られた上清画分を保存した。以下、この上清画分を等電点沈澱可溶性画分と記載する。

（比較例5）上記等電点沈澱法におけるアレルギー物質画分を100mlずつ7個のビーカーに分取し、比較例1と同様に、蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA、ペプシン、パンクレアチン、パパイン、ブロメライン、アクチナーゼ又はアルカロフィリックプロテアーゼを0.12mg加えて、50℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理し、さらに上記ローヤルゼリーの水不溶性画分及び等電点沈澱可溶性画分を加えた。

【0046】（比較例6）上記等電点沈澱法におけるアレルギー物質画分100mlに、比較例2と同様に蛋白質分解酵素のペプシン0.12mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA0.12mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理し、さらに上

記ローヤルゼリーの水不溶性画分及び等電点沈澱可溶性画分を加えた。

【0047】（比較例7）上記等電点沈澱法におけるアレルギー物質画分を100mlずつ5個のビーカーに分取し、比較例3と同様に糖分解酵素のα-マンノシダーゼ、セルラーゼ、アピセラゼ、β-マンノシダーゼ又はα-アミラーゼを0.12mg加えて、50℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理し、さらに上記ローヤルゼリーの水不溶性画分及び等電点沈澱可溶性画分を加えた。

【0048】（比較例8）上記等電点沈澱法におけるアレルギー物質画分100mlに、比較例4と同様に糖分解酵素のセルラーゼ0.12mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、糖分解酵素のβ-マンノシダーゼ0.12mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理し、さらに上記ローヤルゼリーの水不溶性画分及び等電点沈澱可溶性画分を加えた。

【0049】（実施例9）上記等電点沈澱法におけるアレルギー物質画分100mlに、実施例1と同様に蛋白質分解酵素のペプシン0.12mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、糖分解酵素のセルラーゼ0.12mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理し、さらに上記ローヤルゼリーの水不溶性画分及び等電点沈澱可溶性画分を加えた。

【0050】（実施例10）上記等電点沈澱法におけるアレルギー物質画分100mlに、実施例2と同様に蛋白質分解酵素のペプシン0.12mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、糖分解酵素のβ-マンノシダーゼ0.12mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理し、さらに上記ローヤルゼリーの水不溶性画分及び等電点沈澱可溶性画分を加えた。

【0051】（実施例11）上記等電点沈澱法におけるアレルギー物質画分100mlに、実施例3と同様に蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA0.12mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、糖分解酵素のセルラーゼ0.12mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理し、さらに上記ローヤルゼリーの水不溶性画分及び等電点沈澱可溶性画分を加えた。

【0052】（実施例12）上記等電点沈澱法におけるアレルギー物質画分100mlに、実施例4と同様に蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA0.12mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、糖分



解酵素の $\beta$ -マンノシダーゼ0.12mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理し、さらに上記ローヤルゼリーの水不溶性画分及び等電点沈澱可溶性画分を加えた。

【0053】(実施例13) 上記等電点沈澱法におけるアレルギー物質画分100mlを実施例5と同様に98℃で2分間加熱処理した。これに蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA0.06mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、糖分解酵素の $\beta$ -マンノシダーゼ0.06mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理し、さらに上記ローヤルゼリーの水不溶性画分及び等電点沈澱可溶性画分を加えた。

【0054】(実施例14) 上記等電点沈澱法におけるアレルギー物質画分100mlに、実施例6と同様に蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA0.12mgと、糖分解酵素の $\beta$ -マンノシダーゼ0.12mgとを同時に添加し、50℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理し、さらに上記ローヤルゼリーの水不溶性画分及び等電点沈澱可溶性画分を加えた。

【0055】(実施例15) 上記等電点沈澱法におけるアレルギー物質画分100mlに、実施例7と同様に蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA0.06mgと、糖分解酵素の $\beta$ -マンノシダーゼ0.06mgとを同時に添加し、50℃で16時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理し、さらに上記ローヤルゼリーの水不溶性画分及び等電点沈澱可溶性画分を加えた。

【0056】(実施例16) 中国産ローヤルゼリー凍結乾燥粉末50gに純水450mlを加えて均一になるまで攪拌した。このローヤルゼリー懸濁液を、上記<等電点沈澱法によるローヤルゼリーの分画>と同様の工程により分画した。この分画によって得られたアレルギー物質画分100mlに、蛋白質分解酵素のアスペルギロペプチダーゼA0.12mgを添加し、50℃で1時間反応させた。その後、糖分解酵素の $\beta$ -マンノシダーゼ0.12mgを添加し、60℃で1時間反応させた。反応終了後、80℃で30分間加熱処理して酵素を失活させるとともに殺菌処理し、さらに上記ローヤルゼリーの水不溶性画分及び等電点沈澱可溶性画分を加えた。

【0057】<試験例1：SDS-PAGEによる55kDa蛋白質の分解確認>実施例1～16で得られた酵素処理ローヤルゼリーについて、SDS-PAGEによる試験を行い、主要なアレルギーである55kDa蛋白質が分解されているか否かを確認した。なお、実施例9～16においては、ローヤルゼリーの水不溶性画分と等電点沈澱可溶性画分とを加える前のものをサンプルとし

て用いた。

【0058】各サンプルは、1/4量の200mM Tris-HCl (pH6.8)、250mMジチオスレイトール、5%SDS、22.5%グリセロール及び適量のプロモフェノールブルーを含む5×SDSサンプルバッファーを加えて98℃で2分間加熱し、その0.3～0.5 $\mu$ lについて、厚さ0.45mmの8-25%グラジエントポリアクリルアミドゲルを用い、全自動電気泳動システムPhast System<sup>TM</sup> (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社)を使用してSDS-PAGEを行った。なお、分子量マーカーとして、LMW kit E (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社)を用いた。電気泳動後のゲルは、クマシーブリリアントブルーR-350で染色し、30%メタノール及び10%酢酸を含む溶液で脱色した。

【0059】SDS-PAGEの結果、実施例1～16の全てのサンプルに関して、ローヤルゼリー中の主要アレルギーである55kDa蛋白質が分解されていることが確認された。

【0060】<試験例2：ドットブロッティングによる抗原性の確認>比較例1～8及び実施例1～16で得られた酵素処理ローヤルゼリーについて、抗原性が低下しているか否かを調べるために、ドットブロッティングによるin vitroの試験を行った。

【0061】試験に先立ち、以下のとおりローヤルゼリーに対する抗血清を得た。まず、4週齢の雄性ddY系マウスを日本エスエルシー(株)から購入し、7～10日間検疫飼育を行った。次に、生ローヤルゼリー及び酵素処理ローヤルゼリーの蛋白質濃度をBradfordの方法(M. Bradford, Anal. Biochem., 72巻, 248-254頁, 1976年)に基づき、ウシグロブリンをスタンダードに用いて定量を行った。各試料の蛋白質濃度を10mg/mlになるように調製し、フロイント不完全アジュバントを1:1の割合で混合してエマルジョンを作成した。各エマルジョンをマウス1匹あたり0.2ml、10～20匹に腹腔内投与し、10日後に頸動脈より全採血した。血液を3000rpmで10分間遠心分離して血餅を取り除いて抗血清を得た。

【0062】なお、ネガティブコントロールとして、何も投与していないマウスより同様に血清を得てノンイムン血清とした。マウスは、すべての飼育期間を通じて、温度25 $\pm$ 2℃、湿度50 $\pm$ 5%、オールフレッシュ換気回数12回/時、午前8時から12時間照明に条件設定されたセミバリアシステム飼育室内において、PCゲージで8匹ずつ収納し、固形飼料(CE-2、日本クレア)と濾過水道水とを自由に摂取させて飼育した。

【0063】上記のようにして得られた抗血清を用いて、以下のとおりにドットブロッティングを行った。各サンプルをTBS緩衝液(20mM Tris, 500

mM NaCl, pH7.5) で50倍希釈し、Seq u i -B l o t<sup>TM</sup> PVDF膜 (バイオ・ラッド社) にスポットした。コントロールとして、酵素未処理の生ローヤルゼリーを用いた。このPVDF膜をTB S緩衝液に牛血清アルブミンを3% (w/v) になるように加えた溶液に30分間浸してブロッキング処理し、TB S緩衝液 (20mM Tris, 500mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH7.5) で5分間洗浄した。TB S緩衝液に牛血清アルブミンを1% (w/v) になるように加えた溶液で抗血清を10倍に希釈し、ブロッキング処理したPVDF膜を浸して室温で1時間反応させた後、TB S緩衝液で5分間洗浄を2回繰り返した。

【0064】次に、TB S緩衝液に牛血清アルブミンを1% (w/v) になるように加えた溶液で2次抗体 (ヤギ抗マウスIgG, バイオラッド社) を2000倍希釈し、PVDF膜を浸して室温で1時間反応させた後、TB S緩衝液で5分間洗浄を2回繰り返し、TB S緩衝液で5分間洗浄した。最後に、Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (バイオラッド社) を用いて発色させ、抗血清に反応したスポットを検出した。なお、ネガティブコントロールとして、ノンイムン血清を用いた。結果を表1に示す。

【0065】

【表1】

	使用酵素	反応性
比較例1	アスペルギロペプチダーゼA、ペプシン	+++++
	パンクレアチン、パバイン、プロメライン、アクチナーゼ、アルカロフィリックプロテアーゼ	++++++
比較例2	ペプシン+アスペルギロペプチダーゼA	+++++
比較例3	βマンノシダーゼ、セルラーゼ	++++++
	αアミラーゼ、αマンノシダーゼ、アビセラーゼ	++++++
比較例4	セルラーゼ+βマンノシダーゼ	+++++
比較例5	アスペルギロペプチダーゼA、ペプシン	++++++
	パンクレアチン、パバイン、プロメライン、アクチナーゼ、アルカロフィリックプロテアーゼ	++++++
比較例6	ペプシン+アスペルギロペプチダーゼA	+++++
比較例7	βマンノシダーゼ、セルラーゼ	++++++
	αアミラーゼ、αマンノシダーゼ、アビセラーゼ	++++++
比較例8	セルラーゼ+βマンノシダーゼ	+++++
実施例1	ペプシン+セルラーゼ	++++
実施例2	ペプシン+βマンノシダーゼ	++++
実施例3	アスペルギロペプチダーゼA+セルラーゼ	++++
実施例4	アスペルギロペプチダーゼA+βマンノシダーゼ	++
実施例5	アスペルギロペプチダーゼA+βマンノシダーゼ	++
実施例6	アスペルギロペプチダーゼA+βマンノシダーゼ	++
実施例7	アスペルギロペプチダーゼA+βマンノシダーゼ	++
実施例8	アスペルギロペプチダーゼA+βマンノシダーゼ	++
実施例9	ペプシン+セルラーゼ	++++
実施例10	ペプシン+βマンノシダーゼ	++++
実施例11	アスペルギロペプチダーゼA+セルラーゼ	++++
実施例12	アスペルギロペプチダーゼA+βマンノシダーゼ	++
実施例13	アスペルギロペプチダーゼA+βマンノシダーゼ	++
実施例14	アスペルギロペプチダーゼA+βマンノシダーゼ	++
実施例15	アスペルギロペプチダーゼA+βマンノシダーゼ	++
実施例16	アスペルギロペプチダーゼA+βマンノシダーゼ	++

反応性の判定は、発色したスポットの強さの程度により (+) ~ (++++++) の10段階で評価した。なお、前記 (+) は全く又は極めて弱い反応であったことを表し、(++++++) は酵素未処理のローヤルゼリーと同程度に強い反応であったことを表す。

【0066】表1の結果より、ローヤルゼリーを1種類の酵素のみで処理した場合 (比較例1、3、5、7)、蛋白質分解酵素同士を組み合わせで処理した場合 (比較例2、6) 及び糖分解酵素同士を組み合わせで処理した場合 (比較例4、8) では、反応性の低下は見られるものの顕著ではなかった。

【0067】これに対し、蛋白質分解酵素と糖分解酵素とを組み合わせで処理した場合 (実施例1~16) には、反応性の低減効果が著しく増強されたことが確認された。さらに、これらの反応性の低減効果は、アスペルギロペプチダーゼAとβマンノシダーゼとの組み合わせが特に顕著であったことも確認された (実施例4~8及び実施例12~16)。また、反応時間を長くした場合 (実施例7、15) 及びあらかじめ生ローヤルゼリーを加熱処理した場合 (実施例5、13) には、酵素量を減らすことが可能であることも確認された。

50 【0068】<試験例3: in vivoアレルギー検



定>試験例2によって、抗原性の低下が認められたサンプル(比較例2、4、及び実施例1~4、6、8、12、14)について、マウス局所アナフィラキシー法による、ローヤルゼリーのin vivoのアレルゲン検定を行った。

【0069】4週齢の雄性ddY系マウスは、試験例2と同様に購入して飼育した。各サンプルの蛋白質濃度を5mg/mlになるように調製し、フロイント不完全アジュバントを1:1の割合で混合してエマルジョンを作成した。各エマルジョンをマウス1匹あたり0.2ml腹腔内投与して感作し、14日間飼育を行った。順調に

生育したマウスを1群6匹とし、以下の惹起に用いた。

【0070】マウスをエーテル麻酔後、腹部を約3×4cmの広さに刈毛し、0.5%エバンスブルーを0.2ml静脈内投与した。感作に使用したサンプルの蛋白質濃度を1mg/mlになるように調製し、エバンスブルー投与後2分以後に、マウス1匹あたり50μl腹壁皮内投与して惹起した。5~7分後、腹部皮膚を剥離し、惹起によって生じた青色斑の長径と短径を測定して、平均直径を求めた。結果を表2に示す。

【0071】

【表2】

	青染部位一直径(mm)	平均値(mm)
生ローヤルゼリー	12.5, 11.5, 11.5, 12.5, 12.0, 11.0	11.83±0.61
生理食塩水(0.9%NaCl)	1.5, 2.5, 1.0, 3.0, 2.5, 2.5	2.17±0.75
比較例2	10.0, 8.5, 9.5, 10.5, 9.0, 9.0	9.42±0.74
比較例4	8.0, 8.5, 11.0, 10.0, 9.5, 10.5	9.58±1.16
実施例1	5.0, 4.0, 4.5, 5.5, 4.0, 5.0	4.67±0.61
実施例2	4.5, 4.0, 4.0, 5.0, 5.0, 3.0	4.25±0.76
実施例3	4.5, 3.0, 5.0, 4.5, 4.0, 5.5	4.42±0.86
実施例4	1.0, 2.5, 1.5, 2.0, 2.5, 2.0	1.92±0.58
実施例6	2.5, 1.5, 2.5, 2.0, 2.5, 1.5	2.08±0.49
実施例8	2.0, 3.0, 1.5, 2.5, 2.0, 2.0	2.17±0.52
実施例12	2.0, 3.5, 4.0, 2.5, 2.0, 2.5	2.75±0.82
実施例14	3.5, 4.0, 2.0, 2.0, 3.0, 3.0	2.92±0.80

表2の結果より、酵素未処理の生ローヤルゼリーは皮膚に対して強い刺激を与えた。しかし、蛋白質分解酵素のみ(比較例2)、或いは糖分解酵素のみ(比較例4)で処理すると、いずれも刺激性が低下したが顕著ではなかった。これに対し、蛋白質分解酵素及び糖分解酵素で処理した各実施例の低アレルゲン化ローヤルゼリーは、皮膚に対し刺激性がほとんどないものであることが確認された。特に、アスペルギロペプチダーゼAとβ-マンノシダーゼとを組み合わせで処理したローヤルゼリー(実施例4、6、8)では、生理食塩水とほぼ同程度のアレルギー反応であったことが確認された。また、これらの結果は試験例2で示したin vitroの抗原性試験とも相関性が認められる。

【0072】<試験例4：HPLC分析による10-ハイドロキシデセン酸含量の測定>試験例3において抗原性の低下が認められたサンプルのうち、実施例4、8、12について、高速液体クロマトグラフィー(HPLC; 島津製作所製)で分析することによって、ローヤルゼリーの有効成分である10-ハイドロキシデセン酸の含量を測定した。

【0073】10-ハイドロキシデセン酸標品10mgをメタノールで50mlに溶解し、これを純水で適宜希釈して、標準溶液として使用した。安息香酸25mgをメタノールで50mlに溶解し、この1mlを分取して、1N NaOHを1滴加え、純水で50mlにメスアップしたものを内部標準液とした。

【0074】各試料を凍結乾燥してパウダーとし、その0.5gにエタノール10mlと1N NaOH1mlを添加した後、純水で50mlにメスアップした。この2mlを分取し、内部標準液を1ml加えて純水で50mlにメスアップしたものをサンプルとした。無水リン酸20.18g及びリン酸二水素二ナトリウム二水和物27.3gを純水1960mlに溶解し、メタノール1540mlを加えてよく混合し、メンブレンフィルターで濾過した後、移動相として使用した。

【0075】HPLCの条件:

カラム: YMC-Pack ODS (オクタデシル) - AM302、カラム温度: 50℃、検出器: UV210nm、移動相: 10mMリン酸緩衝液(上述のもの)、流量: 1ml/min、サンプル量: 10μl。

【0076】HPLCによるクロマトグラムから定量した10-ハイドロキシデセン酸含量(重量%)を表3に示す。その結果、各実施例の酵素処理した低アレルゲン化ローヤルゼリー中に含まれる10-ハイドロキシデセン酸含量は、生ローヤルゼリーとほとんど同じであったことが確認された。

【0077】

【表3】

	デセン酸含量
生ローヤルゼリー	2. 1 4 %
実施例 4	2. 1 1 %
実施例 8	1. 9 7 %
実施例 1 2	2. 0 3 %

＜試験例 5：経口急性毒性試験＞上記実施例の低アレルゲン化ローヤルゼリーは健康食品として広く応用が期待されるため、その経口急性毒性試験を行った。

【0078】4週齢の雌雄 ddY 系マウスは、試験例 2 と同様に購入して飼育した。検疫飼育後、順調に生育したマウスを 1 群 8 匹とし、6 週齢で試験に用いた。実施例 4 で得られた低アレルゲン化ローヤルゼリーと、乳糖と、バレイショデンプンとを、それぞれ 2：1：1 の重量比で加えてよく混合して粉末化した粉末化飼料を調製した後、0. 5 重量%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を、前記粉末化飼料 5. 0 g に対し 20 ml の割合で添加した懸濁液を飼料として用いた。

【0079】18 時間絶食後、上記懸濁液を金属製胃ゾンデを用いて 1 回強制的に経口投与し、以後 14 日間一般症状等を観察した。なお、投与量は 20 ml / kg と

10

20

し、最大投与量は金属製胃ゾンデ通過可能な量である 5. 0 g / kg とした。コントロールには 0. 5 重量%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を用いた。結果を表 4 に示す。その結果、最大投与量である 5. 0 g / kg を投与した場合でも何ら中毒症状は観察されず、死亡例も全く見られなかった。

【0080】

【表 4】

投与量 (g / kg)	死亡数 / 全体数	
	雄	雌
コントロール	0 / 8	0 / 8
1. 0	0 / 8	0 / 8
3. 0	0 / 8	0 / 8
5. 0	0 / 8	0 / 8

さらに、投与後、0、4、9 及び 14 日目に体重 (g) を測定した。結果を表 5 に示す。その結果、最大投与量である 5. 0 g / kg を投与した場合でも、コントロールと同様の体重の増加が確認された。

【0081】

【表 5】

	投与量 (g / kg)	0 日	4 日	9 日	14 日
雄	コントロール	26. 6 ± 0. 3	32. 3 ± 0. 6	34. 1 ± 0. 8	35. 9 ± 0. 5
	1. 0	26. 5 ± 0. 5	32. 3 ± 0. 5	34. 5 ± 0. 6	36. 0 ± 0. 7
	3. 0	26. 4 ± 0. 4	32. 6 ± 0. 8	35. 1 ± 0. 8	36. 8 ± 0. 7
	5. 0	26. 4 ± 0. 4	31. 8 ± 0. 7	34. 5 ± 0. 4	36. 4 ± 0. 7
雌	コントロール	22. 3 ± 0. 6	26. 0 ± 0. 8	27. 8 ± 0. 4	29. 6 ± 0. 6
	1. 0	22. 3 ± 0. 4	26. 8 ± 0. 9	28. 1 ± 0. 4	29. 1 ± 0. 5
	3. 0	22. 0 ± 0. 4	25. 7 ± 0. 4	28. 3 ± 0. 9	30. 2 ± 0. 9
	5. 0	22. 5 ± 0. 5	25. 7 ± 0. 9	28. 4 ± 0. 7	29. 3 ± 0. 8

以上の結果から、この実施例の低アレルゲン化ローヤルゼリーは、経口投与しても健康上全く問題がないものであることが確認された。

【0082】なお、本実施形態は、次のように変更して具体化することも可能である。

・ 生ローヤルゼリーを水又は緩衝液に希釈せずにそのまま各種酵素と反応させてもよい。このように構成した場合でも、反応速度はやや低下するが、低アレルゲン化ローヤルゼリーを製造することができる。

【0083】・ ローヤルゼリーに含まれるアレルゲン（例えば、上記 47～55 kDa の蛋白質）に対するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を作製し、その抗体を結合させたアフィニティークロマトグラフィー用カラムを用いて、ローヤルゼリーに含まれるアレルゲンを除去することによって低アレルゲン化ローヤルゼリーを製造すること。或いは、前記抗体を用いて、ローヤルゼリー中に含まれるアレルゲンと免疫沈降反応を引き起こさせ、生成した沈澱を遠心分離又は濾過により除去することによって、低アレルゲン化ローヤルゼリーを製造してもよい。このように構成した場合、ローヤルゼリー中の有用な活性成分の消失をより一層効果的に抑えつ

つ、実質的に発現されない程度にアレルギー性を低減させることができる。

【0084】・ 等電点沈澱法におけるアレルギー物質画分を除去することによって、低アレルゲン化ローヤルゼリーを製造してもよい。

・ 糖分解酵素処理又は蛋白質分解酵素処理を省略してもよい。このように構成した場合、上記実施形態の低アレルゲン化ローヤルゼリーと比較して、アレルギー性の低減効果は低いが、酵素未処理のローヤルゼリーと比較すれば、アレルギー性を低減させることができる。

【0085】さらに、前記実施形態より把握できる技術的思想について以下に記載する。

・ ローヤルゼリーを所定量の水又は緩衝液に溶解した後、溶液の pH を 6. 3～7. 3 に調整して等電点沈澱法により沈澱画分を分画して除去したことを特徴とする低アレルゲン化ローヤルゼリーの製造方法。

【0086】・ ローヤルゼリーに、糖分解酵素処理又は蛋白質分解酵素処理を施すことにより、アレルギー性を低減させたことを特徴とする低アレルゲン化ローヤルゼリー。このように構成した場合、ローヤルゼリーのアレルギー性を容易に低減させることができる。

50

## 【0087】

【発明の効果】以上詳述したように、この発明によれば、次のような効果を奏する。請求項1から請求項3に記載の発明の低アレルギー化ローヤルゼリーによれば、実質的に発現されない程度にアレルギー性を低減させることができる。

【0088】請求項4及び請求項5に記載の発明の低アレルギー化ローヤルゼリーの製造方法によれば、実質的に発現されない程度にアレルギー性を低減させることができる低アレルギー化ローヤルゼリーを容易に製造することができる。

---

フロントページの続き

(72)発明者 荒木 陽子  
岐阜市加納桜田町1丁目1番地 アピ 株式会社内  
(72)発明者 坂本 貴  
岐阜市加納桜田町1丁目1番地 アピ 株式会社内

(72)発明者 三島 敏  
岐阜市加納桜田町1丁目1番地 アピ 株式会社内  
Fターム(参考) 4B018 MD76 ME07  
4B041 LC10 LD06 LK40 LP25

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-112715

(43)Date of publication of application : 16.04.2002

AF

(51)Int.Cl.

A23L 1/076  
A23L 1/30

(21)Application number : 2000-303562

(71)Applicant : API CO LTD

(22)Date of filing : 03.10.2000

(72)Inventor : TOMITA KAZUHISA  
SUZUKI KAZUMICHI  
ARAKI YOKO  
SAKAMOTO TAKASHI  
MISHIMA SATOSHI

(54) LOW-ALLERGENIZED ROYAL JELLY AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a low-allergenized royal jelly constituted so as to decrease allergy to an extent not to be substantially manifested, and to provide a method for producing the royal jelly.

SOLUTION: This low-allergenized royal jelly is obtained by subjecting royal jelly to a glycolytic enzyme treatment or a protease treatment, wherein the glycolytic enzyme is preferably  $\beta$ -mannosidase and the protease is preferably a microbial aspartic protease. It is preferable that the low-allergenized royal jelly is produced by dissolving royal jelly in a prescribed amount of water or a buffer solution followed by adjusting pH of the solution to 6.3-7.3, fractionating a precipitate fraction with an isoelectric point precipitate method, and subjecting the resultant precipitate fraction to the glycolytic enzyme treatment or the protease treatment followed by mixing the resultant precipitate fraction with a soluble fraction in the isoelectric point precipitate method.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.08.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3522210

[Date of registration] 20.02.2004

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office